

КРАТКИЕ  
СООБЩЕНИЯ

УДК 577.2.04

СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ  
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОМОТОРА ГЕНА *Pou5f1* (*Oct4*)  
С ГЕНЕТИЧЕСКИМ ОКРУЖЕНИЕМ

© 2020 г. А. А. Кузьмин<sup>а, #</sup>, В. В. Ермакова<sup>а, #</sup>, Е. В. Потапенко<sup>а</sup>,  
М. Г. Островерхова<sup>а</sup>, Н. А. Гурьев<sup>а</sup>, А. Н. Томилин<sup>а, \*</sup>

<sup>а</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук,  
Тихорецкий просп., 4, Санкт-Петербург, 194064 Россия

\*e-mail: a.tomilin@incras.ru

Поступила в редакцию 06.07.2020 г.

После доработки 25.07.2020 г.

Принята к публикации 27.07.2020 г.

Ген *Pou5f1* (*Oct4*) известен как центральный регулятор клеточной плюрипотентности, однако, многие аспекты, связанные с ролью его регуляторных элементов в транскрипционной активности близлежащих генов остаются практически не изученными. В настоящем исследовании мы осуществили биаллельную делецию промотора *Pou5f1* в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) мыши, сохранив при этом плюрипотентные свойства клеток посредством внедрения 9.8-т.п.н. фрагмента гена *Pou5f1* в транс-положение. Полученные результаты подтверждают определенные ранее границы *Pou5f1*, в то время как полученные ЭСК послужат незаменимой моделью для изучения энхансерной роли промотора *Pou5f1* в регуляции транскрипционной активности окружающих его генов.

**Ключевые слова:** *Pou5f1*, cis-регуляторные элементы, эмбриональные стволовые клетки, плюрипотентность, CRISPR/Cas9, *Rosa26*, e-промотор

**DOI:** 10.31857/S0475145020060038

ВВЕДЕНИЕ

Исследования гена *Pou5f1* (*Oct4*), как основного участника формирования плюрипотентной массы клеток в процессе эмбриогенеза млекопитающих начались с конца 80-х годов прошлого века. В дальнейшем была также показана его непосредственная вовлеченность в образование колоний индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК). К настоящему моменту он известен, как ключевой регулятор плюрипотентности, регулирующий транскрипцию ассоциированных с этим состоянием генов, а также как пионер-фактор, способный репрограммировать дифференцированные клетки за счет связывания с закрытым хроматином (Nichols et al., 1998; Iwafuchi-Doi, Zaret, 2014). Однако, многие аспекты, связанные с регуляцией транскрипции самого гена *Pou5f1*, равно как и ролью его регуляторных элементов в транскрипционной активности близлежащих генов остаются не в полной мере изученными.

В 2000 году Niwa с соавторами показали, что снижение или повышение уровня экспрессии *Pou5f1* более чем на 50% ведет к дифференциации клеток в направлении трофэктодермы или мезо-

дермы/первичной энтодермы, соответственно (Niwa et al., 2000). Эти результаты свидетельствовали о наличии в стволовых клетках тонких механизмов контроля экспрессии *Pou5f1*. В дальнейшем был выявлен один из таких механизмов, обеспечиваемый работой проксимального (PE) и дистального энхансера (DE) этого гена. Оказалось, что работа этих энхансеров строго зависит от стадий эмбрионального развития и условий культивирования клеток.

Как известно, плюрипотентные стволовые клетки могут находиться в двух основных состояниях — наивном и праймированном. Первое состояние соответствует клеткам раннего эпибласта до имплантации и обладает уникальными характеристиками. Например, такие клетки экспрессируют, помимо *Oct4* и *Sox2* специфичные маркеры — *Nanog*, *Klf2*, *Klf4*, *Klf5*, *ESRRb*, которые отсутствуют в клетках праймированных, соответствующих позднему эпибласту имплантированного эмбриона. В свою очередь последним соответствуют маркеры *Otx2* и *Zic2*. Кроме того, каждый тип клеток зависит от метода культивирования. Например, для культивирования эпибластных стволовых клеток необходимо присутствие в среде *Fgf2* и *Activin A* (Weinberger et al., 2016). Кроме того, оказалось, что DE

<sup>#</sup> Эти авторы имеют одинаковый вклад в работу.

активен в наивных плюрипотентных клетках, а PE активируется в праймированных клетках (Choi et al., 2016). Таким образом, эти два элемента являются частью механизма, обеспечивающего правильную пространственно-временную регуляцию экспрессии *Pou5f1*.

По мере развития новых молекулярно-биологических методов, в том числе методов геномной инженерии, были выявлены и другие потенциальные цис-регуляторные элементы, влияющие на уровень экспрессии гена *Pou5f1*. Так, используя библиотеку гидовых РНК системы CRISPR/Cas9 был разработан метод CREST-seq, применив который, авторы обнаружили 45 CRE-элементов (цис-регуляторных элементов) для *Pou5f1*. Удаление этих областей ДНК оказывало влияние на уровень экспрессии гена *Pou5f1*. Интересно, что 17 из таких элементов представляли собой промоторы других генов и находились за пределами DE и PE (Diao et al., 2017). Такие промоторы могут представлять собой так называемые e-промоторы — регуляторные элементы, сочетающие в себе свойства как энхансеров, так и промоторов. Более того, Dao с соавторами показали, что 2–3% промоторов кодирующих генов могут проявлять энхансерную активность (Dao et al., 2017). По ряду признаков промотор *Pou5f1* может выступать в роли e-промотора, и исследование такой возможности представляет несомненный интерес ввиду локализации *Pou5f1* в локусе, высоко обогащенном генами.

Одним из таких признаков служит исследование, связывающее последовательность *POU5F1* с аутоиммунными заболеваниями. Авторами соответствующей работы было показано, что полиморфизмы нуклеотидной последовательности в области промотора этого гена ассоциированы с патогенезом псориаза (Chang et al., 2007).

В настоящем исследовании мы осуществили биаллельную делецию промотора *Pou5f1*, обеспечив при этом само-поддержание ЭСК за счет внедренной в дистальное геномное расположение функциональной копии гена *Pou5f1*. Полученные таким образом ЭСК послужат удобной моделью изучения роли промотора гена *Pou5f1* в качестве e-промотора.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Плазмиды.** Для CRISPR/Cas9-опосредованного внедрения конструкций в локус *Rosa26* использовалась модифицированная плаزمиды рX330-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9, несущая в себе последовательности Cas9, гидРНК и флуоресцентный белок mCherry для селекции клеток. Последовательность гидРНК была подобрана с использованием онлайн платформы Benchling ([www.benchling.com](http://www.benchling.com)).

**Клеточные линии.** ЭСК мыши линии *Pou5f1<sup>flx/flx</sup>*, в которых промотор и первый экзон гена *Pou5f1* фланкированы LoxP сайтами, были описаны ра-

нее (Kehler et al., 2004). В качестве фидерных клеток использовали мышинные эмбриональные фибробласты (МЭФ), полученные из 14-дневных эмбрионов мышей.

**Получение митомицин-инактивированных фибробластов и приготовление фидерного слоя.** МЭФ, полученные от мышей линии C57/BL6, культивировали на 10-сантиметровых культуральных чашках (Eppendorf). По достижении 100% плотности, среду меняли на минимальный объем свежей среды, содержащей Митомицин-С (Sigma) в конечной концентрации 10 мкг/мл. После инкубации в течение 2.5 ч клетки промывали PBS, снимали трипсином и рассеивали в концентрации  $36 \times 10^3/\text{см}^2$  или хранили в жидком азоте.

**Культивирование клеток.** ЭСК мыши культивировали в ЭСК-среде, в состав которой входили: Knockout DMEM (Gibco), 15% эмбриональная бычья сыворотка (Sigma), 100 ед./мл пенициллин (Gibco), 100 мкг/мл стрептомицин (Gibco), 2 мМ L-глутамин (Gibco), заменимые аминокислоты (NEAA, Gibco), hLIF (Leukemia inhibitory factor — лейкоз-ингибирующий фактор), приготовленный в лабораторных условиях. Пересев клеток проводился с использованием 0.05% раствора трипсина-EDTA. ЭСК растили на культуральном пластике, покрытом фидерным слоем митомицин-инактивированных фибробластов. Среду меняли каждый день или через день в зависимости от плотности ЭСК.

**Временная трансфекция.** Временная трансфекция осуществлялась в лунках 24-луночного планшета с использованием реагента FuGene HD (Promega). За день до трансфекции клетки рассеивались в плотности  $10 \times 10^3/\text{см}^2$ . За час до добавления трансфекционной смеси клеткам заменяли среду на бессывороточную (OptiMEM (Gibco) с добавлением hLIF). Через 12 ч после трансфекции среду заменяли на стандартную ЭСК-среду. Еще через день клетки рассеивали на 6-см чашки и подвергали селекции на соответствующем антибиотике.

**Клонирование гидовой последовательности.** Гидовую последовательность клонировали в вектор рX330-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9 по сайтам BpiI. Для этого исходную плазмиду линейаризовали ферментом BpiI (Thermo Fisher Scientific), выделяли и использовали в качестве вектора. В качестве вставки использовали синтезированные олигонуклеотиды, длиной 24–25 нуклеотидов, содержащие специфическую гидовую последовательность (20–21 нуклеотидов) и короткую последовательность, соответствующую сайту рестрикции (4 нуклеотида). Два частично комплементарных олигонуклеотида смешивали в 10 мкл 1-кратного лигазного буфера, плавили при 96°C в термостате, после чего медленно остужали до 40°C. В дальнейшем лигирование с 50–100 нг вектора проводили по стандартному протоколу.

**Создание генетической конструкции для переноса локуса *Pou5f1*.** Плазмиду Rosa26-GOF-2APuro получали в два этапа. Сначала, последовательность 2A-Puro (P2A-сайт, соединенный с геном устойчивости к пуромицину) встраивали в плазмиду pGOF18, содержащую 18-килобазный геномный фрагмент, охватывающий ген *Pou5f1* (Yeom et al., 1996). Встраивание производили перед стоп-кодоном, сохраняя рамку считывания. После этого, из полученной конструкции вырезали фрагмент 11 т.п.н., включающий последовательность 2A-Puro и геномную последовательность *Pou5f1* (положение  $-5.4...+4.9$  т.п.н. относительно точки начала транскрипции) и встраивали в плазмиду Ai65(RCFL-tdT) (Addgene, Cat. 61577), содержащую плечи гомологии к *Rosa26*.

**Геномное редактирование.** Для встраивания в локус *Rosa26* при помощи CRISPR/Cas9 технологии была использована гидРНК 5'-ACTC-CAGTCTTTCTAGAAGA-3'. После короткой селекции клоны ЭСК отбирали на антибиотике пуромицине с рабочей концентрацией 1 мкг/мл. В дальнейшем отобранные колонии генотипировали методом ПЦР на наличие всех необходимых модификаций.

**Иммуноцитохимическое окрашивание.** Иммуноцитохимическое окрашивание выполняли по стандартному лабораторному протоколу с использованием первичных антител против Oct4 (SantaCruz, C10, 1 : 500), Nanog (Bethyl a300-397a, 1 : 250), Sox2 (Invitrogen pa1094x, 1 : 250), Rex1 (Invitrogen pa5-27567, 1:200), а также Klf4 (Abcam 129473, 1 : 250). Протокол включал в себя фиксацию в 4% PFA в течение 10 мин, этапы пермеабиллизации с Triton X100 (0.1%, 10 мин), блокировки в PBS с добавлением 1% БСА и 2% овечьей сыворотки. Фиксированные клетки инкубировали с первичными антителами в течение 2 ч при комнатной температуре. Вторичные антитела, меченные Cy3 или Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch) разводили в соотношении 1 : 500 и инкубировали с клетками в течение полутора часов при комнатной температуре.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

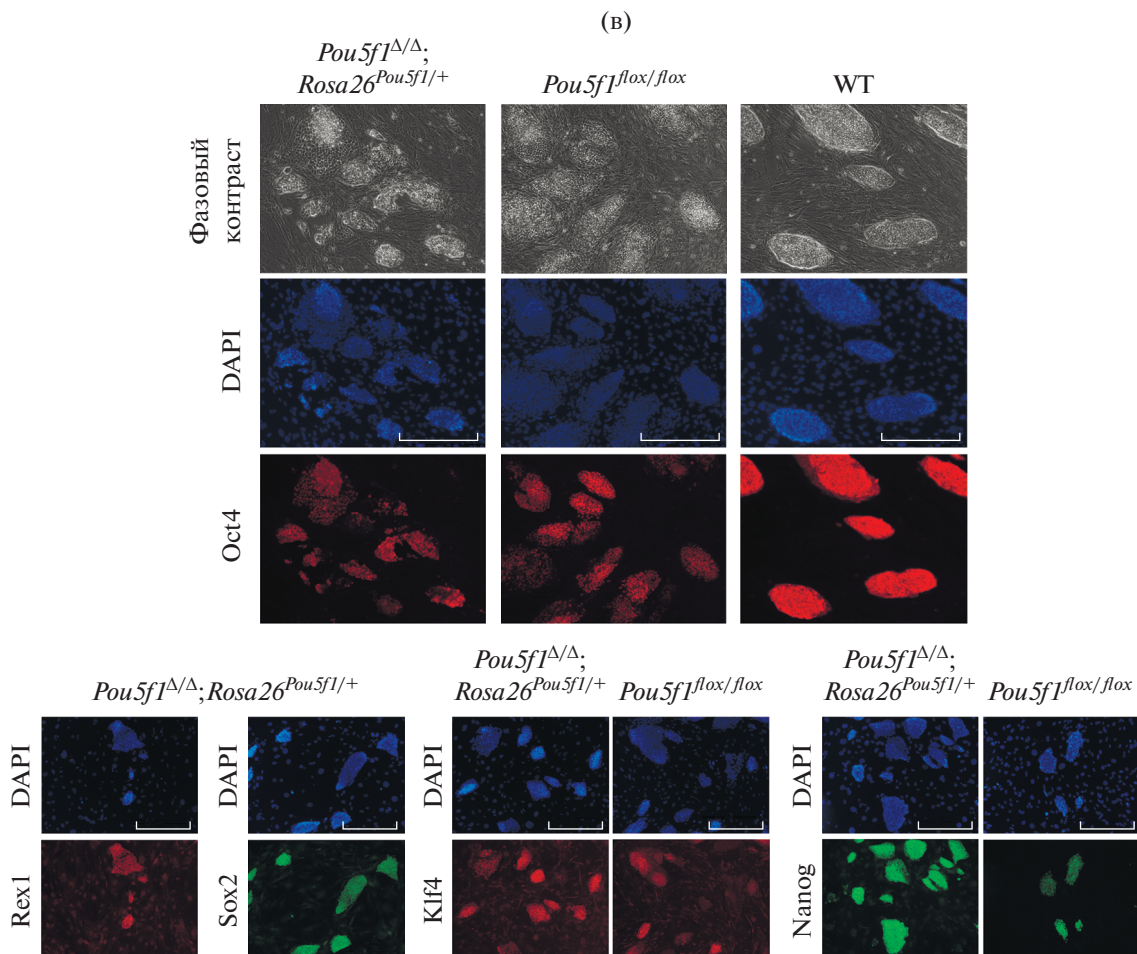
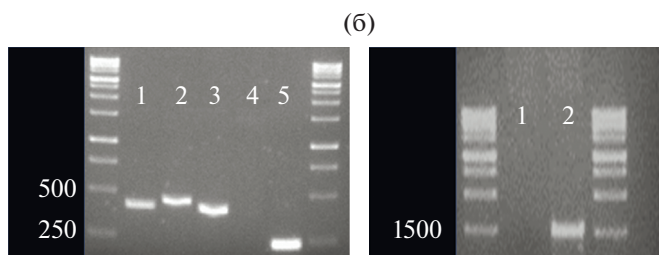
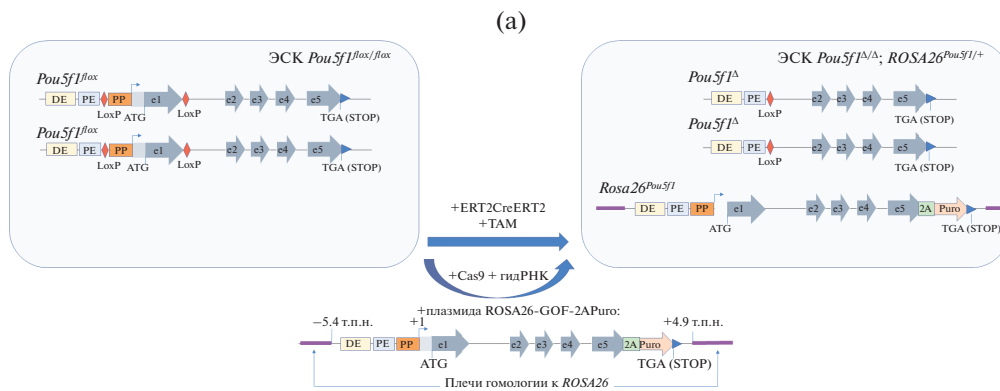
В качестве объекта исследования были выбраны ранее полученные нами ЭСК мыши, в которых промотор и первый экзон *Pou5f1* в обоих аллелях был фланкирован loxP-сайтами (*Pou5f1<sup>lox/lox</sup>*) (Kehler et al., 2004).

Для создания модельной системы, в ЭСК *Pou5f1<sup>lox/lox</sup>* были удалены промотор (PP) и первый экзон (ex1) обоих аллелей *Pou5f1<sup>lox/lox</sup>*, для чего клетки трансфецировали плазмидой, экспрессирующей сшитую с доменами эстрогенового рецептора ERT2 Cre-рекомбиназу. Вход рекомбиназы в ядро и выщепление указанных участков запускались посредством добавления в среду ли-

ганда – тамоксифена. Продукт такого выщепления (*Pou5f1<sup>Δ/Δ</sup>*) является нефункциональным аллелем (Kehler et al., 2004), что ведет к дифференцировке ЭСК. Для сохранения плюрипотентного статуса клеток, одновременно с инактивацией *Pou5f1<sup>lox/lox</sup>*, в локус *Rosa26* при помощи гомологичной рекомбинации, индуцируемой системой CRISPR/Cas9 (Bressan et al., 2017), вводили последовательность гена *Pou5f1*, охватывающую экзоны и интроны гена, а также его промотор (PP), проксимальный (PE) и дистальный энхансеры (DE) (положение  $-5.4...+4.9$  т.п.н. относительно точки начала транскрипции, рис. 1а), являющиеся необходимыми и достаточными элементами для тонкой регуляции его работы в раннем/позднем эпибласте. Кроме того, для отбора мутантных клонов, непосредственно перед стоп-кодоном была встроена последовательность устойчивости к пуромицину, экспрессирующаяся в составе бицистронной последовательности совместно с *Pou5f1*. Отобранные клоны генотипировали на наличие делеции по обоим аллелям, а также на наличие вставки в локус *Rosa26* (рис. 1б). Описание стратегии генотипирования флоксированных аллелей было приведено ранее (Kehler et al., 2004). Ампликон, характеризующий вставку, соответствует 1.48-т.п.н. фрагменту, амплифицирующемуся праймерами, с 5'-конца затрагивающими *Rosa26* локус левее плеча гомологии, а с 3'-конца – фрагмент встраиваемого *Pou5f1*. Суммарно, из 20 отобранных клонов, у 10 были удалены флоксированные области по обоим аллелям, и у 6 из них был подтвержден перенос локуса в *Rosa26*. Таким образом, в результате проведенных манипуляций были успешно получены 6 клонов ЭСК *Pou5f1<sup>Δ/Δ</sup>; Rosa26<sup>Pou5f1/+</sup>*.

Локус *Rosa26* широко используется для получения трансгенных клеточных линий, в том числе с применением системы CRISPR/Cas9. Подход, основанный на внедрении геномной последовательности *Pou5f1* в данный локус был выбран по причине необходимости получения генетически равноценных линий клеток для дальнейшего адекватного анализа и сравнения. В противном случае, из-за неопределенного количества копий при получении стабильных линий, а также из-за неизвестной геномной локализации таких инсерций, возможность сделать конкретные и всеобъемлющие выводы при сравнении линий оставалась бы спорной.

Согласно статье Karwacki-Neisius с соавторами, уменьшение уровня экспрессии *Pou5f1* может приводить к усилению плюрипотентных характеристик клеток, таких как повышенный уровень экспрессии Nanog, пониженная частота спонтанной дифференцировки и усиленное связывание белка Oct4 с энхансерами, ассоциированными с состоянием плюрипотентности (Karwacki-Neisius et al., 2013). В данном исследовании авторы получили и использовали гетерозиготную (*Pou5f1<sup>+/-</sup>*)



**Рис. 1.** Получение и первичный анализ модельной линии ЭСК  $Pou5f1^{\Delta/\Delta}; Rosa26^{Pou5f1/+}$ . (а) Схема генетических манипуляций с исходными ЭСК  $Pou5f1^{lox/lox}$  позволившие делетировать промотор (PP) и удержать ЭСК в плюрипотентном состоянии посредством внедрения 10.3-т.п.н. (тысяч пар нуклеотидов) фрагмента гена  $Pou5f1$  в локус  $Rosa26$ . (б) Пример результатов генотипирования получаемых клонов. На левой картинке отображены результаты проверки вырезания промотора и первого экзона  $Pou5f1$ . 1 – ЭСК дикого типа, 2, 4 – ЭСК  $Pou5f1^{lox/lox}$ , 3, 5 – ЭСК  $Pou5f1^{\Delta/\Delta}; Rosa26^{Pou5f1/+}$ . Бэнды в районе 500 п.н. соответствуют детектированию флоксированного (+34 п.н. за счет LoxP сайта) и/или дикого аллеля  $Pou5f1$ . Бэнд в районе 250 нуклеотидов соответствует детектированию делеции промотора и первого экзона  $Pou5f1$ . На правой картинке – детектирование встраивания последовательности гена  $Pou5f1$  в локус  $Rosa26$ , которому соответствует 1.48-т.п.н. ампликон. 1 – ЭСК  $Pou5f1^{lox/lox}$ , 2 – ЭСК  $Pou5f1^{\Delta/\Delta}; Rosa26^{Pou5f1/+}$ . (в) Окрашивание полученных линий  $Pou5f1^{\Delta/\Delta}; Rosa26^{Pou5f1/+}$  на маркеры плюрипотентности – Oct4, Nanog, Rex1, Sox2, Klf4. Сравнение по ряду маркеров с клетками ЭСК дикого типа и клетками ЭСК  $Pou5f1^{lox/lox}$ . Сокращения на рисунке: PP – промотор, DE – дистальный энхансер, PE – проксимальный энхансер, e1-5 – экзоны гена  $Pou5f1$ , 2A – P2A сайт, PuroR – ген устойчивости к пуромицину, TAM – тамоксифен.

линию ЭСК ОКО160. В нашем же случае, помимо создания гетерозиготности, единственный функциональный аллель  $Pou5f1$  был помещен в новое генетическое окружение, локус  $Rosa26$ . За исключением некоторых морфологических отличий, полученные ЭСК  $Pou5f1^{\Delta/\Delta}; Rosa26^{Pou5f1/+}$  обладали сходными с ЭСК  $Pou5f1^{lox/lox}$  и клетками дикого типа характеристиками, продолжали нормально пролиферировать, а также конститутивно экспрессировали основной маркер плюрипотентности – белок Oct4. Помимо этого, полученные клетки экспрессировали другие маркеры плюрипотентности, такие как Nanog, Sox2, Klf4, и Rex1. Интересно, что в сравнении с контролем ЭСК  $Pou5f1^{\Delta/\Delta}; Rosa26^{Pou5f1/+}$  показали более равномерное распределение Klf4, а также более высокий уровень Nanog, что полностью соответствует результатам анализа ЭСК линии ОКО160 (Karwacki-Neisius et al., 2013). Таким образом, полученный результат позволяет сделать заключение о том, что перенос одной копии гена в указанных выше размерах в эктопическое положение не отражается на плюрипотентных свойствах ЭСК мыши.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученный в настоящей работе результат показывает, что перенос одной копии гена в эктопическое положение не отражается на жизнеспособности ЭСК мыши. Такие клетки сохраняют свою пролиферативную активность и экспрессируют продукт  $Pou5f1$  – Oct4 на необходимом для самообновления ЭСК уровне. Таким образом, можно сделать вывод о том, что определенные ранее границы  $Pou5f1$  охватывают все регуляторные элементы, необходимые для функционирования ЭСК (Yeom et al., 1996). Дальнейшие исследования, однако, должны показать, достаточно ли этих элементов для перехода  $Pou5f1$  в неактивное состояние в ходе дифференцировки ЭСК, равно как и для ее нормального прохождения.

Помимо этого, полученные в настоящей работе ЭСК линии  $Pou5f1^{\Delta/\Delta}; Rosa26^{Pou5f1/+}$  будут являться ценным инструментом при изучении энхансерной функции промотора  $Pou5f1$  в отношении окру-

жающих его генов. Дальнейшее сравнение уровней экспрессии генов в клетках с перенесенным локусом  $Pou5f1$  и в клетках с интактным аллелем помогут указать на наличие такой функции. А дальнейшее применение методов 3C (Chromosome Conformation Capture) поможет это доказать. Изучение энхансерных функций промотора  $Pou5f1$  представляет несомненный интерес ввиду его локализации в хромосомном локусе, высоко обогащенном генами, вовлеченными в различные биологические процессы.

Сравнивая нашу модель с другими известными клеточными моделями, позволяющими замечать функцию гена  $Pou5f1$ , можно отметить линию ЭСК ZHTc6 (Niwa et al., 2000). Создание этой линии, однако, ставило целью оценку влияния уровня белка Oct4 на судьбу ЭСК мыши и никак не отвечает нашими целями, так как промотор гена в ЭСК ZHTc6 остается интактным. Кроме того, в указанной работе для поддержания плюрипотентности ЭСК был использован трансген кДНК Oct4 под управлением CMV-промотора, что не позволяет оценить регуляцию самого  $Pou5f1$ .

Кроме того, интересным является факт сохранения плюрипотентных свойств полученных клеток при инактивации его эндогенной экспрессии. С одной стороны, это не удивительно, т.к. уже были получены и клетки ZHTc6, и была продемонстрирована исключительная важность проксимального и дистального энхансеров  $Pou5f1$  (Choi et al., 2016). С другой стороны, плюрипотентные свойства этих клеток требуют дальнейших подтверждений, например, со стороны динамики дифференцировок в разные зародышевые листки. Недавно было показано, что существует дополнительная характеристика плюрипотентных стволовых клеток при смене наивного и праймированного состояний, так называемая “стадия розетки” (Neagu et al., 2020). Возможно, будут найдены и другие, новые стадии в процессе дифференцировки ЭСК, которые можно будет обнаружить, сравнивая полученные нами линии с контрольными. В таком случае мы также вероятно сможем охарактеризовать элементы, отвечающие за регуляцию и правильное прохождение таких стадий.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарим коллег лаборатории за ценные советы и обсуждения.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-00-00324 (создание генетических конструкций), гранта РНФ № 20-14-00242 (получение клеточных линий), а также гранта РФФИ 20-34-90083 (анализ полученных линий на соответствующие маркеры).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены. Люди в данном исследовании не участвовали в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

## ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

А.А. Кузьмин, А.Н. Томилин: дизайн исследования, интерпретация данных, составление рукописи. В.В. Ермакова, А.А. Кузьмин, Е.В. Потапенко, М.Г. Островерхова, Н.А. Гурьев: создание генетических конструкций, клеточных линий, сбор и анализ данных.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Bressan R.B., Dewari P.S., Kalantzaki M. et al. Efficient CRISPR/Cas9-assisted gene targeting enables rapid and precise genetic manipulation of mammalian neural stem cells // *Development*. 2017. V. 144. № 4. P. 635–648.  
Chang Y.T., Hsu C.Y., Chou C.T. et al. The genetic polymorphisms of POU5F1 gene are associated with psoriasis

vulgaris in Chinese // *J. Dermatological Science*. 2007. V. 46. № 2. P. 153–156.  
Choi H.W., Joo J.Y., Hong Y.J. et al. Distinct enhancer activity of Oct4 in naive and primed mouse pluripotency // *Stem Cell Reports*. 2016. V. 7. № 5. P. 911–926.  
Dao L.T.M., Galindo-Albarrán A.O., Castro-Mondragon J.A. et al. Genome-wide characterization of mammalian promoters with distal enhancer functions // *Nature Genetics*. 2017. V. 49. № 7. P. 1073.  
Diao Y., Fang R., Li B. et al. A tiling-deletion-based genetic screen for cis-regulatory element identification in mammalian cells // *Nature Methods*. 2017. V. 14. № 6. P. 629–635.  
Iwafuchi-Doi M., Zaret K.S. Pioneer transcription factors in cell reprogramming // *Genes & Development*. 2014. V. 28. № 24. P. 2679–2692.  
Karwacki-Neisius V., Göke J., Osorno R. et al. Reduced Oct4 expression directs a robust pluripotent state with distinct signaling activity and increased enhancer occupancy by Oct4 and Nanog // *Cell Stem Cell*. 2013. V. 12. № 5. P. 531–545.  
Kehler J., Tolkunova E., Koschorz B. et al. Oct4 is required for primordial germ cell survival // *EMBO Reports*. 2004. V. 5. № 11. P. 1078–1083.  
Neagu A., van Genderen E., Escudero I. et al. In vitro capture and characterization of embryonic rosette-stage pluripotency between naive and primed states // *Nature Cell Biology*. 2020. V. 22. № 5. P. 534–545.  
Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K. et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4 // *Cell*. 1998. V. 95. № 3. P. 379–391.  
Niwa H., Miyazaki J., Smith A.G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells // *Nature Genetics*. 2000. V. 24. № 4. P. 372–376.  
Yeom Y.I., Fuhrmann G., Ovitt C.E. et al. Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells // *Development*. 1996. V. 122. № 3. P. 881–894.  
Weinberger L., Ayyash M., Novershtern N., Hanna J.H. Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2016. V. 17. № 3. P. 155.

## Establishing a Cell Model for Studying the Interaction of the *Pou5f1* (*Oct4*) Promoter with the Genetic Environment

A. A. Kuzmin<sup>1</sup>, V. V. Ermakova<sup>1</sup>, E. V. Potapenko<sup>1</sup>, M. G. Ostroverkhova<sup>1</sup>, N. A. Guriev<sup>1</sup>, and A. N. Tomilin<sup>1</sup> \*

<sup>1</sup>*Institute of Cytology Russian Academy of Sciences, Tikhoretsky ave. 4, St. Petersburg, 194064 Russia*

\*e-mail: a.tomilin@incras.ru

*Pou5f1* (*Oct4*), a key gatekeeper of cellular pluripotency, has little been studied with the regard to roles of its regulatory *cis*-elements in transcriptional control of neighboring genes. In this study we have performed bi-allelic deletion of the *Pou5f1* promoter with simultaneous rescue of mouse embryonic stem cell (ESC) self-renewal by a 9.8-kb fragment of *Pou5f1* knocked into the *Rosa26* locus. Our results confirm previously established *Pou5f1* gene boundaries, whereas the generated ESCs will be indispensable for further studies of *Pou5f1* promoter in transcriptional regulation of neighbor genes.

**Keywords:** *Pou5f1*, *cis*-regulatory elements, embryonic stem cells, pluripotency, CRISPR/Cas9, *Rosa26*, ePromoter